

# 中华蜜蜂 *dynactin p62* 基因的克隆及不同发育阶段表达分析

曾 晶<sup>#</sup>, 潘其忠<sup>#</sup>, 王子龙, 吴小波, 颜伟玉, 曾志将<sup>\*</sup>

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

**摘要:** 为探究中华蜜蜂 *Apis cerana cerana dynactin p62* 基因的表达特性, 本研究克隆了中华蜜蜂 *dynactin p62* 的基因组 DNA 序列 (GenBank 登录号: JX101463) 和 mRNA 序列 (GenBank 登录号: JX101464); 采用荧光定量 PCR 检测了中华蜜蜂 *dynactin p62* 在不同发育时期 (3 日龄和 6 日龄幼虫、刚羽化出房蜜蜂) 三型蜂中 mRNA 的表达量。结果表明: 该基因基因组 DNA 序列全长为 2 403 bp, mRNA 序列全长为 1 491 bp, 编码 496 个氨基酸残基, 预测的蛋白分子量为 56.49 kD, 等电点为 8.31。系统发育分析表明中华蜜蜂 *dynactin p62* 与西方蜜蜂 *Apis mellifera dynactin p62* 聚成一支。该基因在不同发育时期均有表达, 在雌性蜜蜂 (蜂王和工蜂) 中, 刚羽化成虫期的表达量显著高于幼虫期 ( $P < 0.05$ ), 并且同一发育时期相比, 工蜂的表达量显著高于蜂王 ( $P < 0.05$ ); 而该基因在雄蜂中表达量没有明显的规律性。这些结果提示该基因可能与中华蜜蜂级型分化有关。

**关键词:** 中华蜜蜂; *dynactin p62*; 基因克隆; 序列分析; 差异表达

**中图分类号:** Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2012)10-1132-10

## Cloning and developmental expression of *dynactin p62* gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

ZENG Jing<sup>#</sup>, PAN Qi-Zhong<sup>#</sup>, WANG Zi-Long, WU Xiao-Bo, YAN Wei-Yu, ZENG Zhi-Jiang<sup>\*</sup>  
(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** To explore the expression characteristics of *dynactin p62* gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, the genomic DNA sequence (GenBank accession no. JX101463) and mRNA sequence (GenBank accession no. JX101464) of *dynactin p62* in *A. cerana cerana* were cloned, and a quantitative analysis of its expression level at different developmental stages of the queen, worker and drone (3 and 6 d-old larvae, and newly eclosed bees) was conducted using real-time PCR. The full-length genomic DNA and mRNA sequences of *A. c. cerana dynactin p62* are 2 403 bp and 1 491 bp, respectively, encoding 496 amino acids, and the predicted MW and pI are 56.49 kD and 8.31, respectively. Phylogenetic analysis indicated that *dynactin p62* of both *A. c. cerana* and *A. mellifera* gathered in the same clade. The *A. c. cerana dynactin p62* transcript was clearly detected at different developmental stages of the queens and workers, and it was expressed significantly higher in newly eclosed adults than in larvae ( $P < 0.05$ ); and its expression was higher in workers than in queens ( $P < 0.05$ ), but with no obvious regularity in drone. These results suggest that *dynactin p62* may be involved in caste differentiation in *A. c. cerana*.

**Key words:** *Apis cerana cerana*; *dynactin p62*; gene cloning; sequence analysis; differential expression

*dynactin* (dynein activator complex) 是真核细胞中的多结构蛋白, 其主要功能是附着纤维蛋白和动力蛋白, 并将其转运至细胞器和泡囊。*dynactin p62* 是 *dynactin* 蛋白的 3 个组成部分之一, 位于末端,

生成的 *dynactin p62* siRNA 能有效干扰外源基因的表达, 同时 *dynactin p62* 能识别并连接 ATP 水解酶, 并调节其活性。在人 *Homo sapiens* 细胞中 *dynactin p62* 的主要功能是维持 *dynactin* 蛋白结构

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20103603110003); 江西省自然科学基金项目 (2010GZ0044)

作者简介: 曾晶, 女, 1988 年 11 月生, 江西萍乡人, 硕士研究生, E-mail: zeng.jing6668@163.com; 潘其忠, 男, 1989 年 12 月生, 江西赣州人, 硕士研究生, E-mail: panqizhong1989@163.com

<sup>#</sup> 共同第一作者 Authors with equal contribution

<sup>\*</sup> 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 0791-83828158; E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期 Received: 2012-08-10; 接受日期 Accepted: 2012-10-16

和大脑皮层细胞结构(Karki *et al.*, 2000); 在小鼠 *Mus musculus* 中 *dynactin p62* 与核转运基因 *Ropy-2* 高度同源, 主要功能是连接蛋白质的氨基末端和维持细胞与蛋白质结构(Garces *et al.*, 1999); 在果蝇 *Drosophila* 中 *dynactin p62* 的生物功能未知(Kucharski *et al.*, 2008)。有研究表明, 营养变化可导致果蝇中 *dynactin p62* 表达的差异(Kucharski *et al.*, 2008)。

随着西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组测序的完成, 西方蜜蜂 *dynactin p62* (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) 也被预测出来。澳大利亚国立大学 Kucharski 等(2008) 受果蝇实验启示, 通过检测 *dynactin p62* 甲基化水平的差异来研究西方蜜蜂雌性蜜蜂级型分化, 结果发现营养因素可通过影响 DNA 甲基化水平调控蜜蜂级型分化。Shi 等(2011) 首次发现空间因素也可以通过影响 *dynactin p62* 的甲基化来调控西方蜜蜂雌蜂的发育。给西方蜜蜂雌蜂 3 d 幼虫头部注射 Dnmt3 siRNA, 可以显著降低幼虫头部 *dynactin p62* 甲基化水平(Kucharski *et al.*, 2008; 石元元等, 2011)。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国宝贵的蜂种资源, 也是相对西方蜜蜂之外被大量家养的一个独立蜂种, 两蜂种间存在生殖隔离。但引人关注的事实是, 自中国引进西方蜜蜂 100 多年以来, 中华蜜蜂分布区域和种群数量都明显减少, 导致山林生物多样性降低(杨冠煌, 2005)。

大量研究表明, 西方蜜蜂 *dynactin p62* 甲基化与级型分化相关(Kucharski *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2011; 石元元等, 2011), 但人们对中华蜜蜂 DNA 甲基化模式知之甚少。鉴于目前还没有关于中华蜜蜂 *dynactin p62* 的研究报道, 为此我们对中华蜜蜂 *dynactin p62* 进行了克隆及差异表达分析, 以期研究中华蜜蜂级型分化的机理奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试蜜蜂: 取自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂。

1.1.2 主要试剂与仪器: 动物基因组 DNA 提取试剂盒(PUEX, 北京); 胶回收试剂盒(PUEX, 北京); 总 RNA 提取试剂盒 Trizol, pEasy-T3 载体, Trans-DH5 $\alpha$  感受态细胞, X-gal, IPTG, RNA 酶抑制剂购自全式金公司; DNA marker DL2000, M-

MLV 反转录酶及 SYBR Green II 荧光定量试剂购自 TaKaRa 公司; dNTPs, LA-Taq DNA polymerase 及 DNA 凝胶回收试剂盒购自 PUEX 公司。DYY-4C 型电泳仪(北京六一科技有限公司产品), 飞鸽 KA-1000 型普通离心机(上海安亭科学仪器厂公司产品), 3H2ORI 型台式冷冻离心机(Eppendorf 5810R), 移液枪(Eppendorf 公司产品), 超净工作台(苏净集团安泰公司产品), 533ZR659878 型 PCR 仪(Eppendorf Mastercycler Personal), 564BR0381 型 Real-Time PCR System (Bio-Rad 公司产品)。

### 1.2 中华蜜蜂 *dynactin p62* 基因组 DNA 序列的克隆

1.2.1 DNA 的提取: 随机取健康蜂群巢房内 10 头工蜂为蜜蜂样品。取每头蜜蜂样品头胸部组织切碎, 按照动物基因组 DNA 提取试剂盒(PUEX, 北京)操作说明提取 DNA。

1.2.2 中华蜜蜂 *dynactin p62* 引物设计和 PCR 扩增: 根据 GenBank 登录的西方蜜蜂的 *dynactin p62* 基因组 DNA 序列, 利用 OLIGO 6.0 软件设计 3 对 PCR 扩增引物(表 1), 由上海生工生物工程公司合成。

PCR 扩增反应体系: 以提取的 DNA 作为模板, 反应总体积为 25  $\mu$ L, 含模板 4  $\mu$ L, Buffer 2.5  $\mu$ L, 2  $\mu$ L dNTPs, 0.3  $\mu$ L LA-Taq DNA polymerase, 上下游引物各 1  $\mu$ L, 14.2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C 和 56.6 $^{\circ}$ C (分别对应 3 对引物)退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存待取。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后, 蒸馏水漂洗, 凝胶成像系统观察分析。

1.2.3 PCR 产物回收和克隆、鉴定及序列测定: 利用 DNA 琼脂糖凝胶试剂盒回收 PCR 产物, PCR 产物经切胶回收后连接到 pEasy-T3 载体上(按试剂盒说明操作), 将连接产物转化至 Trans-DH5 $\alpha$  感受态细胞, 然后涂布在含有 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 15 h。经蓝白斑筛选后, 挑取 6 个阳性克隆在 LB 液体培养基(含 Amp<sup>+</sup>)中, 于 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜, 通过菌液 PCR 进行初步鉴定后, 由上海英骏生物技术有限公司完成测序工作。

### 1.3 中华蜜蜂 *dynactin p62* mRNA 序列的克隆

1.3.1 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成: 随机取健康蜂群巢房内工蜂为蜜蜂样品, 取样后蜜蜂样品立即放入液氮速冻, -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于提取总

表 1 中华蜜蜂 *dynactin p62* 基因引物  
Table 1 Primers of *dynactin p62* of *Apis cerana cerana*

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequences
DNA 序列 Genomic DNA cloning	dynactin-F1	AATTCAAAATTTAATCTAATATAGGGA
	dynactin-R1	GAGGATTTTCTTGTCAGGCC
	dynactin-F2	TGGACATCTAGAGATGCTGGCA
	dynactin-R2	GTTTGATGTTGAGTTGGATTGCA
	dynactin-F3	CCACTTCGTCCAGGTAAATCAA
	dynactin-R3	ATATGTGTGCAGCCTGAGAATG
mRNA 序列克隆 mRNA cloning	Dctn4-F1	ATTGAGAAATGTATCGCTTTATGAC
	Dctn4-R1	TGTCTATGTTGAGGGCGTAATTC
	Dctn4-F2	ACAACATCCGGACATACAAGC
	Dctn4-R2	ATGTGTGCAGCCTGAGAATG
实时荧光定量 PCR qRT-PCR	P62-F1	ACCACTTCGCCCAGGTAAAT
	P62-R1	GGCACTTGTCGCACGATAGA
	Bact-Q-F	GGCTCCCGAAGAACATCC
	Bact-Q-R	TGCGAAACACCGTCACCC

RNA。每个样品用研钵在液氮中研磨后,用 Trizol 试剂盒进行 RNA 的提取。所有操作均按照试剂盒说明书进行, RNA 最后溶于 30  $\mu\text{L}$  RNA-free 的 DEPC 水中,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后,放入  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录,反应体系为 50  $\mu\text{L}$ : 8  $\mu\text{L}$  总 RNA, 10  $\mu\text{L}$  Buffer, 8  $\mu\text{L}$  dNTPs, 1.5  $\mu\text{L}$  M-MLV 反转录酶, 3  $\mu\text{L}$  OligodT, 1  $\mu\text{L}$  RNA 酶抑制剂, 18.5  $\mu\text{L}$  DEPC 水。反转录反应条件如下: 体系混匀后,  $42^{\circ}\text{C}$  反应 60 min,  $75^{\circ}\text{C}$  5 min。反转录产物稀释一倍后保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  待用。

**1.3.2 中华蜜蜂 *dynactin p62* 引物设计和 PCR 扩增:** 根据前面已测出的中华蜜蜂 *dynactin p62* 的基因组 DNA 序列,利用 OLIGO 6.0 软件设计 2 对 PCR 扩增引物(表 1),由上海生工生物工程公司合成。

PCR 扩增反应体系: 以合成的 cDNA 作为模板,每个反应体系 25  $\mu\text{L}$ , 包含模板 4  $\mu\text{L}$ , Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 0.3  $\mu\text{L}$  LA-Taq DNA polymerase。扩增程序:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55.4^{\circ}\text{C}$  和  $57.5^{\circ}\text{C}$  (分别对应 2 对引物)退火 45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 30 s, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min;  $4^{\circ}\text{C}$  保存待取。

**1.3.3 PCR 产物回收和克隆、鉴定及序列测定:**

利用 DNA 琼脂糖凝胶试剂盒回收 PCR 产物, PCR 产物经切胶回收后连接到 pEasy-T3 载体上(按试剂盒说明操作),将连接产物转化至 Trans-DH5 $\alpha$  感受态细胞,然后涂布在含有 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 平板上,  $37^{\circ}\text{C}$  倒置培养 15 h。经蓝白斑筛选后,挑取 6 个阳性克隆在 LB 液体培养基(含 Amp $^{+}$ )中,于  $37^{\circ}\text{C}$  震荡培养过夜,通过菌液 PCR 进行初步鉴定后,由上海英骏生物技术有限公司完成测序工作。

**1.4 序列分析**

利用 DNASTAR 软件将测序后获得的 *dynactin p62* 的基因组 DNA 和 cDNA 克隆序列分别进行组装,获得完整的 *dynactin p62* 基因组 DNA 和 mRNA 序列,利用 NCBI 的 BLAST 程序进行序列相似性比对分析;采用 ClustalX 软件将中华蜜蜂与西方蜜蜂 *dynactin p62* 的基因组 DNA 序列和 mRNA 序列及其编码的氨基酸序列分别进行比对。采用 Bioedit 软件对中华蜜蜂 *dynactin p62* mRNA 序列进行六读框翻译;采用 Mega4.1 软件对已报道的物种的 *dynactin p62* 的氨基酸序列进行系统进化树的构建。

**1.5 中华蜜蜂 *dynactin p62* mRNA 相对表达量的测定**

**1.5.1 取样:** 选群势相近的健康中华蜜蜂蜂群 5 群,随机分为 5 个重复。在同一中华蜜蜂蜂群内,

蜂王、工蜂和雄蜂分别取 3 日龄(每个样品取 4 头幼虫)、6 日龄幼虫(每个样品取 1 头幼虫)和 1 日龄刚羽化的幼蜂(每个样品取 1 头幼蜂),以上样品都是取 5 份平行样。取样后蜜蜂样品立即放入液氮速冻,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,用于提取总 RNA。

**1.5.2 定量引物设计:** 在中华蜜蜂 *dynactin p62* 阅读框区设计多对特异引物用于定量 PCR 反应,根据 Livak 和 Schmittgen (2001)的方法,本研究对设计的特异性荧光定量 PCR 引物进行了筛选,获得符合要求的特异性引物,用于后续的实时荧光定量 PCR 反应。同时本研究以  $\beta$ -Actin 基因作为内参基因,引物为  $\beta$ act-Q-F 和  $\beta$ act-Q-R。荧光定量所用引物序列见表 1。

**1.5.3 荧光定量 PCR 反应:** qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 4  $\mu\text{L}$  反转录产物,目的基因上游和下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 5.2  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green II; PCR 扩增程序:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $63.7^{\circ}\text{C}$  和  $65.5^{\circ}\text{C}$  (分别对应目的基因引物和内参基因引物)退火 45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 40 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 最后以每 5 s 上升  $0.5^{\circ}\text{C}$  的速度从  $61^{\circ}\text{C}$  到  $95^{\circ}\text{C}$  记录熔解曲线,每个反转录 cDNA 样品。实验重复 4 次。

## 1.6 数据统计与分析

各基因在不同发育阶段表达量的差异通过 qRT-PCR 反应后收集目的基因(*dynactin p62*)与内参基因( $\beta$ -Actin)的  $C_T$  值,用 qPCR Package (Spiess and Ritz, 2010), R 软件(Hornik 2011)计算扩增效率,计算基因相对表达量( $r$ )的数据分析方法参考 Huang 等(2012)。

## 2 结果与分析

### 2.1 中华蜜蜂 *dynactin p62* 扩增与鉴定

由于目前还没有中华蜜蜂基因组序列,因此本研究以西方蜜蜂 *dynactin p62* 的基因组序列为参考设计了 3 对引物对中华蜜蜂 *dynactin p62* 基因组 DNA 序列进行 PCR 扩增,经过克隆测序,获得了长度为 2 403 bp 的中华蜜蜂基因组序列。同时以工蜂 cDNA 为模板,用 2 对基因特异性引物进行 PCR 扩增,经克隆测序获得了长度为 1 491 bp 的中华蜜蜂 *dynactin p62* mRNA 序列。将所得中蜂 *dynactin p62* 的氨基酸序列在 NCBI Nr 数据库进行同源性检索,表明其与西方蜜蜂 *dynactin p62* 蛋白最相似。同时将中蜂 *dynactin p62* 的基因组 DNA 序列和

mRNA 序列与西方蜜蜂 *dynactin p62* 的相应序列进行比对分析,结果表明它们之间的一致性分别为 96% 和 98% (图 1, 图 2),表明所获得的序列是中华蜜蜂 *dynactin p62* 基因序列。

### 2.2 中华蜜蜂 *dynactin p62* 编码蛋白与其他物种相应蛋白比较分析

序列测定结果表明得到的中华蜜蜂 *dynactin p62* 开放阅读框(ORF)全长为 1 491 bp(图 3),编码 496 个氨基酸残基,预测分子量为 56.49 kDa,等电点为 8.31。

将中华蜜蜂 *dynactin p62* 氨基酸序列与已经报道的其他物种的 *dynactin p62* 氨基酸序列进行了同源性比较(图 4),结果表明:中华蜜蜂 *dynactin p62* 氨基酸序列(GenBank 登录号: AFP58804)与西方蜜蜂 *Apis mellifera* (GenBank 登录号: XP\_001121083)、熊蜂 *Bombus impatiens* (GenBank 登录号: XP\_003492272)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (GenBank 登录号: NP\_610311)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (GenBank 登录号: XP\_001650614)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (GenBank 登录号: XP\_316886)、华支睾吸虫 *Clonorchis sinensis* (GenBank 登录号: GAA48949)、人(GenBank 登录号: NP\_001129115)、小鼠(GenBank 登录号: NP\_080578) 8 个物种的 *dynactin p62* 氨基酸序列的一致性分别为 88%, 91%, 54%, 55%, 53%, 46%, 52% 和 57%。同时,本研究采用 Mega 4.1 软件对这 9 个物种的 *dynactin p62* 氨基酸序列构建系统进化树(图 5),结果表明,中华蜜蜂 *dynactin p62* 与西方蜜蜂 *dynactin p62* 聚成一支。

### 2.3 中华蜜蜂 *dynactin p62* mRNA 相对表达量分析

利用荧光定量 PCR 分析了中华蜜蜂 *dynactin p62* 在不同发育时期(3 日龄和 6 日龄幼虫、刚羽化出房蜜蜂)三型蜂中的 mRNA 表达差异(图 6),结果显示:该基因在不同发育时期均有表达,在雌性蜜蜂(蜂王和工蜂)中,都是刚羽化时期表达量显著高于幼虫期 ( $P < 0.05$ ),并且同一发育时期相比,都是工蜂的表达量显著高于蜂王 ( $P < 0.05$ );而该基因在雄蜂中表达量没有明显的规律性。

## 3 讨论

本研究首次克隆了中华蜜蜂 *dynactin p62*, 其基



<i>Apis mellifera</i>	-----TT	2
<i>Apis cerana cerana</i>	AATTCAAAAATTAATCTAATATAGGGATTTTTATTTTAACTAAAAAGTTTACTGTACTT	60
<i>Apis mellifera</i>	ACTATATACTATACGTGTATTAAGATGGCTTAAAGAAAAGTTATAGTTTAGATTGAGA	62
<i>Apis cerana cerana</i>	ACTATATACTATACGTGTATTAAGATGGCTTAAAGAAAAGTTATAGTTTAGATTGAGA	120
<i>Apis mellifera</i>	GATGATATCGCTTTATGACAAAGTGAACTTTATTTTCTTTTCTATAGTAACAAATAT	122
<i>Apis cerana cerana</i>	ATGATATCGCTTTATGACAAAGTGAACTTTATTTTCTTTTCTATAGTAACAAATAT	180
<i>Apis mellifera</i>	ATATTCTCATGTCATATTTAAATCAACCGATTGTGTACATTATGTATGAATTGTGG	182
<i>Apis cerana cerana</i>	ATATTCTCATGTCATATTTAAATCAACCGATTGTGTACATTATGTATGAATTGTGG	240
<i>Apis mellifera</i>	TTCTTTAAACCAATTTTGAAGATTATTTCTCTAGGCAATGCTCCAAATTCGTTGCGG	242
<i>Apis cerana cerana</i>	TTCTTTAAACCAATTTTGAAGATTATTTCTCTAGGCAATGCTCCAAATTCGTTGCGG	300
<i>Apis mellifera</i>	ATATTGTGCTGTCAAGAGGTATAATTTATTTATTTTAAATATACATATAATGAATCT	302
<i>Apis cerana cerana</i>	ATATTGTGCTGTCAAGAGGTATAATTTATTTATTTTAAATATACATATAATGAATCT	357
<i>Apis mellifera</i>	CAAAATTTTCTTAAATAAAAGTATAAAAAATTTGTATAATATATATATAAAAAATTA	362
<i>Apis cerana cerana</i>	CAAAATTTTCTTAAATAAAAGTATAAAAAATTTGTATAATATATATATAAAAAATTA	397
<i>Apis mellifera</i>	TATAATTTATATATTTTATATGTAAAAAAATTTTATTTTAAATTAATAGGTTGATTG	420
<i>Apis cerana cerana</i>	-----ATTTTATATGTAAAAAAATTTTATTTTAAATTAATAGGTTGATTG	444
<i>Apis mellifera</i>	ACATTATTGTCTTAACCTGTATGGAAAATTTACCATCATCAGAAGTTCGTCTTAAAAAAAT	480
<i>Apis cerana cerana</i>	ACATTATTGTCTTAACCTGTATGGAAAATTTACCATCATCAGAAGTTCGTCTTAAAAAAAT	504
<i>Apis mellifera</i>	CAAGTAAATTTTAAATACATATGAAGTTTAAATATATAATTTTATTTAAATTTATAAT	540
<i>Apis cerana cerana</i>	CAAGTAAATTTTAAATACATATGAAGTTTAAATATATAATTTTATTTAAATTTATAAT	564
<i>Apis mellifera</i>	CTTTTACACTTTTAAATAGATGTTCAAATTTGTTCAAATGTCCTGTTGCTTTCAAACA	600
<i>Apis cerana cerana</i>	CTTTTACACTTTTAAATAGATGTTCAAATTTGTTCAAATGTCCTGTTGCTTTCAAACA	624
<i>Apis mellifera</i>	TTATCTACAAGAGCTGGACATGTACCTTTAAGAGTAAATACCAATTGAAGGAGAAGATTCT	660
<i>Apis cerana cerana</i>	TTATCTACAAGAGCTGGACATGTACCTTTAAGAGTAAATACCAATTGAAGGAGAAGATTCT	684
<i>Apis mellifera</i>	AAAGATATAAAACAACACCTTAAAGTTTATTTATTTTGTTCATATGTCGATGG	720
<i>Apis cerana cerana</i>	AAAGATATAAAACAACACCTTAAAGTTTATTTATTTTGTTCATATGTCGATGG	744
<i>Apis mellifera</i>	ACATCTAGAGATGCTGGATACACGATCAATCTGTAGGTATGTTTATTTCAAATTTATA	780
<i>Apis cerana cerana</i>	ACATCTAGAGATGCTGGATACACGATCAATCTGTAGGTATGTTTATTTCAAATTTATA	804
<i>Apis mellifera</i>	ATTTACAATATTTTATATATATATAATTTAAATGCTTTTAAATTTAAATTAAT	838
<i>Apis cerana cerana</i>	ATTTACAATATTTTATATATATATAATTTAAATGCTTTTAAATTTAAATTAAT	856
<i>Apis mellifera</i>	ATATTTTAATTAGCTACAGGAGGTTGGCTGAACAAGAAAATCCTCATACAAACCGGATT	898
<i>Apis cerana cerana</i>	ATATTTTAATTAGCTACAGGAGGTTGGCTGAACAAGAAAATCCTCATACAAACCGGATT	916
<i>Apis mellifera</i>	AATACCTTTAATTGATTATCATAAAATATTAGCTTCTATAGAAAACAGCAATGTGAGAAA	958
<i>Apis cerana cerana</i>	AATACCTTTAATTGATTATCATAAAATATTAGCTTCTATAGAAAACAGCAATGTGAGAAA	976
<i>Apis mellifera</i>	AAGAATTTTCGACCAAGCGTCCCTTATATGCAAAATGTAATAAATTTAAAAATTAATTTA	1018
<i>Apis cerana cerana</i>	AAGAATTTTCGACCAAGCGTCCCTTATATGCAAAATGTAATAAATTTAAAAATTAATTTA	1036
<i>Apis mellifera</i>	GAAAGAAATTTATTTTAAACCATGTTATTAATTTTATTTATTGTTATTTTAGGCTATGT	1078
<i>Apis cerana cerana</i>	GAAAGAAATTTATTTTAAACCATGTTATTAATTTTATTTATTGTTATTTTAGGCTATGT	1095
<i>Apis mellifera</i>	TTAGAATAACATCTGCTATGGTTCGTAACGATTTGGACATCCTACAAAACCTCTACTGT	1138
<i>Apis cerana cerana</i>	TTAGAATAACATCTGCTATGGTTCGTAACGATTTGGACATCCTACAAAACCTCTACTGT	1155
<i>Apis mellifera</i>	AATCAACTGATCAACCATCTCCAGCTTTGCCAGTACAGAAGTAGAGGAATTACCAATAG	1198
<i>Apis cerana cerana</i>	AATCAACTGATCAACCATCTCCAGCTTTGCCAGTACAGAAGTAGAGGAATTACCAATAG	1215
<i>Apis mellifera</i>	ATATTTTTCAGAACCAATAGAAATAACCAAGAGTAGGTAGTATTTATTTTATTTAAAT	1258
<i>Apis cerana cerana</i>	ATATTTTTCAGAACCAATAGAAATAACCAAGAGTAGGTAGTATTTATTTTATTTAAAT	1275
<i>Apis mellifera</i>	AATATTTTCTGTTATTTAAGAAATAACCAAGAGATATCAATTTTCAAATATTAGTTACT	1318
<i>Apis cerana cerana</i>	AATATTTTCTGTTATTTAAGAAATAACCAAGAGATATCAATTTTCAAATATTAGTTACT	1334
<i>Apis mellifera</i>	ACATTGGAACAACGATTACAACATCCGGACATACAAGCAGAAAATGTAATGAATTACGT	1378
<i>Apis cerana cerana</i>	ACATTGGAACAACGATTACAACATCCGGACATACAAGCAGAAAATGTAATGAATTACGT	1394
<i>Apis mellifera</i>	CCTCAACATAGACAATTTGTTAGTTAGAAGATCACAACGATGCGAGTTTGGCAACATAAT	1438
<i>Apis cerana cerana</i>	CCTCAACATAGACAATTTGTTAGTTAGAAGATCACAACGATGCGAGTTTGGCAACATAAT	1454
<i>Apis mellifera</i>	CTCTGTAAACCAGATTTTGTACACATCTGCAAAATTTAAAAATACAATTAGCTGCATTG	1498
<i>Apis cerana cerana</i>	CTCTGTAAACCAGATTTTGTACACATCTGCAAAATTTAAAAATACAATTAGCTGCATTG	1514
<i>Apis mellifera</i>	TAAGTTTATATTTTATTAATATTATTAATAATAAATTAATTAATTAATTTTGTCTTTAA	1558
<i>Apis cerana cerana</i>	TAAGTTTATATTTTATTAATATTATTAATAATAAATTAATTAATTAATTTTGTCTTTAA	1529
<i>Apis mellifera</i>	TAATTAATTTCTTCTTCTCTTCAGTTTATATTAATTTATGATATTTTATCATAGTT	1618
<i>Apis cerana cerana</i>	---TAATTTCTTCTCTTCTTCTTCAGTTTATATTAATTTATGATATTTTATCATAGTT	1578
<i>Apis mellifera</i>	ATCATGTACCAGAAGTAAGGATTGTTACTTTGTGAACCACTTCCGCCAGGTAATCAAGTG	1678
<i>Apis cerana cerana</i>	ATCATGTACCAGAAGTAAGGATTGTTACTTTGTGAACCACTTCCGCCAGGTAATCAAGTG	1638
<i>Apis mellifera</i>	AATTGCTTTTAAAGTTTTCGAATCCAACCTCAACATCAAACTCAGATAATACCTTTTATCAT	1738
<i>Apis cerana cerana</i>	AATTGCTTTTAAAGTTTTCGAATCCAACCTCAACATCAAACTCAGATAATACCTTTTATCAT	1698
<i>Apis mellifera</i>	TGGATACACCATTTGACACCTATTTTAAACAGCTGTTGATGAAAAAGAGAACTTAAGCAAG	1798
<i>Apis cerana cerana</i>	TGGATACACCATTTGACACCTATTTTAAACAGCTGTTGATGAAAAAGAGAACTTAAGCAAG	1758
<i>Apis mellifera</i>	AAAATAACAAACAGGTAAATATTTTAAATATTTTCTAAATTATATTTTAAATATTCGA	1858
<i>Apis cerana cerana</i>	AAAATAACAAACAGGTAAATATTTTAAATATTTTCTAAATTATATTTTAAATATTCGA	1818
<i>Apis mellifera</i>	ATAATTCAGGGATCTGAATCTCCAAATTTATTACCTTCTATCGTGGCAAGTGCTGT	1918
<i>Apis cerana cerana</i>	ATAATTCAGGGATCTGAATCTCCAAATTTATTACCTTCTATCGTGGCAAGTGCTGT	1878
<i>Apis mellifera</i>	AGTAGAGGAAACAAATCTATTAAAAATTAATGCAAAATGCAGATATAATCTTCTCATAG	1978
<i>Apis cerana cerana</i>	AGTAGAGGAAACAAATCTATTAAAAATTAATGCAAAATGCAGATATAATCTTCTCATAG	1938
<i>Apis mellifera</i>	CGCTCTTATTTTGCCTCCAGAGATGATGCTGCTGAATATGATGATACTGGTGATCTCA	2038
<i>Apis cerana cerana</i>	CGCTCTTATTTTGCCTCCAGAGATGATGCTGCTGAATATGATGATACTGGTGATCTCA	1998
<i>Apis mellifera</i>	TAATTTTCAAGATGATCTAAGTATGAATTTTGTGTTTTTAAATTTGAAATATTTTAAAT	2098
<i>Apis cerana cerana</i>	TAATTTTCAAGATGATCTAAGTATGAATTTTGTGTTTTTAAATTTGAAATATTTTAAAT	2057
<i>Apis mellifera</i>	TAGATCTAATTTATTTTATTTTGTAGGCTTGAATTTGGCGAAAAGGTAATAAAGC	2158
<i>Apis cerana cerana</i>	TAGATCTAATTTATTTTATTTTGTAGGCTTGAATTTGGCGAAAAGGTAATAAAGC	2117
<i>Apis mellifera</i>	TGTAATAAAATACATGTAATACCACATGAAAATATACAGAAAGCATAGTCAACAGT	2218
<i>Apis cerana cerana</i>	TGTAATAAAATACATGTAATACCACATGAAAATATACAGAAAGCATAGTCAACAGT	2177
<i>Apis mellifera</i>	TATAATTTGGCTTTGTTATGCAATATGGATATGTAATCTATTACTACATTAGAACATAA	2278
<i>Apis cerana cerana</i>	TATAATTTGGCTTTGTTATGCAATATGGATATGTAATCTATTACTACATTAGAACATAA	2237
<i>Apis mellifera</i>	AGCACCTCAAAAATTAGATCTTAAAGTTAAACTTTATCTTACTATAGGCAATATTGTTGG	2338
<i>Apis cerana cerana</i>	AGCACCTCAAAAATTAGATCTTAAAGTTAAACTTTATCTTACTATAGGCAATATTGTTGG	2297
<i>Apis mellifera</i>	AAATGCTTA-----	2347
<i>Apis cerana cerana</i>	AAATGCTTAATGCTTATATCATATGAATATTAATATTATTAATATTAAAAATAAGTT	2357
<i>Apis mellifera</i>	-----	
<i>Apis cerana cerana</i>	CAATTAACCTCAGTAAATAATATACATTCTCAGGCTGCACACATAT 2403	

图1 中华蜜蜂和西方蜜蜂 *dynactin p62* 基因组 DNA 序列比较Fig. 1 Alignment of genomic sequences of *dynactin p62* between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*

<i>Apis mellifera</i>	ATGTCATATTTAAATCAACCTGATTGTGTACATTATGTATGTAATTGTGGTCTTTAAAA	60
<i>Apis cerana cerana</i>	ATGTCATATTTAAATCAACCTGATTGTGTACATTATGTATGTAATTGTGGTCTTTAAAA	60
<i>Apis mellifera</i>	CCAATTTGGAAGATTATTTCTGTAGGCACTGCTCCAAAATTCGTTGCCGATATTGTGTG	120
<i>Apis cerana cerana</i>	CCAATTTGGAAGATTATTTCTGTAGGCACTGCTCCAAAATTCGTTGCCGATATTGTGTG	120
<i>Apis mellifera</i>	TGTCAAGAGGTTGATTACATTATTGTCTTAACGTATGGAAAATTTACCATCATCAGAA	180
<i>Apis cerana cerana</i>	TGTCAAGAGGTTGATTACATTATTGTCTTAACGTATGGAAAATTTACCATCATCAGAA	180
<i>Apis mellifera</i>	GTTCGTCTTAAAAAACAATGTTCAAAATGTTTCAAATGTCCTGTTGCTTTCAACA	240
<i>Apis cerana cerana</i>	GTTCGTCTTAAAAAACAATGTTCAAAATGTTTCAAATGTCCTGTTGCTTTCAACA	240
<i>Apis mellifera</i>	TTATCTACAAGAGCTGGACATGTACCTTTAAGAGTAATACCAATTGAAGGAGAAGATTCT	300
<i>Apis cerana cerana</i>	TTATCTACAAGAGCTGGACATGTACCTTTAAGAGTAATACCAATTGAAGGAGAAGATTCT	300
<i>Apis mellifera</i>	AAAGATATAAAACACACCTAAAAAAGTTTATTATTATTTTGTTCACATATGCGATGG	360
<i>Apis cerana cerana</i>	AAAGATATAAAACACACCTAAAAAAGTTTATTATTATTTTGTTCACATATGCGATGG	360
<i>Apis mellifera</i>	ACATCTAGAGATGCTGGCATACAGATCAATCTGTAGCTACAGGAGTTGGCTGAACAA	420
<i>Apis cerana cerana</i>	ACATCTAGAGATGCTGGCATACAGATCAATCTGTAGCTACAGGAGTTGGCTGAACAA	420
<i>Apis mellifera</i>	GAAAACTCTCA TACAAACCGGATTAATACCTTTAATTGATTATCATAAAAATTAGCTTCT	480
<i>Apis cerana cerana</i>	GAAAACTCTCA TACAAACCGGATTAATACCTTTAATTGATTATCATAAAAATTAGCTTCT	480
<i>Apis mellifera</i>	ATAGAAAAACAGCAATGTGAGAAAAAGAAATTCGACCAAGCGTCTTATATGCAAAAT	540
<i>Apis cerana cerana</i>	ATAGAAAAACAGCAATGTGAGAAAAAGAAATTCGACCAAGCGTCTTATATGCAAAAT	540
<i>Apis mellifera</i>	GCTATGTTTGAATAACATCTGCTATGGTTCGTAAACGTATTGGACATCTACAAAACCT	600
<i>Apis cerana cerana</i>	GCTATGTTTGAATAACATCTGCTATGGTTCGTAAACGTATTGGACATCTACAAAACCT	600
<i>Apis mellifera</i>	CTACTGAATCAACTGATCAACCATCTCCAGCTTTTGCCAGTACAGAAGTAGAGGAATTA	660
<i>Apis cerana cerana</i>	CTACTGAATCAACTGATCAACCATCTCCAGCTTTTGCCAGTACAGAAGTAGAGGAATTA	660
<i>Apis mellifera</i>	CCAATAGATATTTTACAGAACCAATAGAAATAACCAAGATTACTACATTGGAACACAG	720
<i>Apis cerana cerana</i>	CCAATAGATATTTTACAGAACCAATAGAAATAACCAAGATTACTACATTGGAACACAG	720
<i>Apis mellifera</i>	TTACAACATCCGGACATACAAGCAGAAAAATGTAATGAATTACGCTCTCAACA TAGACAA	780
<i>Apis cerana cerana</i>	TTACAACATCCGGACATACAAGCAGAAAAATGTAATGAATTACGCTCTCAACA TAGACAA	780
<i>Apis mellifera</i>	TTGTTAGTTAGAAGATCACAACGATGTCGAGTTTGCAGAACATAATCTCTGTAAACAGAT	840
<i>Apis cerana cerana</i>	TTGTTAGTTAGAAGATCACAACGATGTCGAGTTTGCAGAACATAATCTCTGTAAACAGAT	840
<i>Apis mellifera</i>	GTAAGGATTGTTACTTGTGAACCACTTCCTCCAG-----	934
<i>Apis cerana cerana</i>	GTAAGGATTGTTACTTGTGAACCACTTCCTCCAGGTAATCAAGTGAATTGCTTTTAAAG	960
<i>Apis mellifera</i>	-----	-
<i>Apis cerana cerana</i>	TTTGTCAATCCAACTCAACATCAAACTCAGATAATACTTTTATCATTGGATACACCATTG	1020
<i>Apis mellifera</i>	-----CTGTTGATGAAAAAGAAGAACTTAAGCAAGAAAAATACAAACAG	978
<i>Apis cerana cerana</i>	ACACCTATTTTAAACAGCTGTTGATGAAAAAGAAGAACTTAAGCAAGAAAAATACAAACAG	1080
<i>Apis mellifera</i>	GGATCTGAATCTCCAAATTTATTACCTTCTATCGTGGCAGCAAGTGCTGTATAGAGGAA	1038
<i>Apis cerana cerana</i>	GGATCTGAATCTCCAAATTTATTACCTTCTATCGTGGCAGCAAGTGCTGTATAGAGGAA	1140
<i>Apis mellifera</i>	ACCAATCTAT TAAAAATTAATGCAAAATGCAGATATAATCTCTCTCA TAGCGCTCTTAT	1098
<i>Apis cerana cerana</i>	ACCAATCTAT TAAAAATTAATGCAAAATGCAGATATAATCTCTCTCA TAGCGCTCTTAT	1200
<i>Apis mellifera</i>	TTGCCCTCCAGAGATGATGCTGCTGAATATGATGATCTGGTGATACATATAATTTTCAA	1158
<i>Apis cerana cerana</i>	TTGCCCTCCAGAGATGATGCTGCTGAATATGATGATCTGGTGATACATATAATTTTCAA	1260
<i>Apis mellifera</i>	GATGATCTTAACTTTGTAATTTGGCGAAAAGGTAA TAAAGCTGTAATAAAATTTACATGTA	1218
<i>Apis cerana cerana</i>	GATGATCTTAACTTTGTAATTTGGCGAAAAGGTAA TAAAGCTGTAATAAAATTTACATGTA	1320
<i>Apis mellifera</i>	ATACCACATGAAAAATATACAGAAAAGTGATAGTCAACAGTTATAATTGGCTTTGTTATG	1278
<i>Apis cerana cerana</i>	ATACCACATGAAAAATATACAGAAAAGTGATAGTCAACAGTTATAATTGGCTTTGTTATG	1380
<i>Apis mellifera</i>	CAATATGGATA TGTGAATACTATTACTACATTAGAACATAAAGCACCTCAAAAATTAGAT	1338
<i>Apis cerana cerana</i>	CAATATGGATA TGTGAATACTATTACTACATTAGAACATAAAGCACCTCAAAAATTAGAT	1440
<i>Apis mellifera</i>	CTTAAAGTTAACTTTATCTTACTATAGGCAATATGTTGGAAATGCTTAA	1389
<i>Apis cerana cerana</i>	CTTAAAGTTAACTTTATCTTACTATAGGCAATATGTTGGAAATGCTTAA	1491

图2 中华蜜蜂和西方蜜蜂 *dynactin p62* mRNA 序列比较Fig. 2 Sequence alignment of *dynactin p62* mRNA sequences between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*

基因组 DNA 序列全长为 2 403 bp, cDNA 序列全长为 1 491 bp, 推测蛋白质序列为 496 个氨基酸, 预测分子量为 56.49 kD, 等电点为 8.31。序列比对和氨基酸系统发育树分析表明, 中华蜜蜂 *dynactin p62* 与西方蜜蜂 *dynactin p62* 的相似性为 88%。

随着西方蜜蜂基因组的公布, 科学家首次在昆虫中发现了一个完善的功能性 DNA 甲基化系统 (Wang *et al.*, 2006; Zeng and Soojin, 2010)。DNA 甲基化是在 DNA 甲基化转移酶的作用下使 CpG 双核苷酸 5' 端的胞嘧啶转变为甲基胞嘧啶。这种

DNA 修饰方式并没有改变基因序列, 但是它调控了基因的表达 (Wu and Morris, 2001; Dahl and Guldberg, 2003)。

蜜蜂级型发育分化机理一直是个热点问题。大量研究表明, 西方蜜蜂级型分化与 *dynactin p62* 甲基化水平有着密切联系 (Kucharski *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2011; 石元元等, 2011)。中华蜜蜂蜜蜂级型分化是否与 DNA 甲基化相关, 目前还不清楚, 但有研究表明: 中华蜜蜂 DNA 甲基化转移酶基因 cDNA 序列与西方蜜蜂一致性高达 99% (刘亭亭等, 2012)。

ATTGAGAAATGTATCGCTTTATGACAAAGTGAAGTGTGATTTCTTTTCTAAATAGTAACAAATATATATTCAATC  
ATGTCATATTTAAATCAACCCGATTGTGTACATATGTATGTAATTGTGGTTCTTTAAACCAATTTCGAAGATTATTTTC  
M S Y L N Q P D C V H Y V C N C G S L K P I S K I Y R  
TGCAGGCACTGCTCCAAAATTCGTTGCGGATATTGTGTCTGTCAAGAGGTTGATTCACATTATTGCCTAACTGTATGGAA  
C R H C S K I R C G Y C V C Q E V D S H Y C P N C M E  
AATTTACCATCATCAGAAAGTTCTGTCTTAAAAAAAACAAATGTTCAAATTGTTCAAATGTCCATGTTGCTTTCAAACATTA  
N L P S S E V R L K K N K C S N C F K C P C C F Q T L  
TCTACAAGAGCTGGACATGTACCTTTAAGAGTAATACCAATTGAAGGAGAAGATTCTAAAGATATAAAAACAACACCTAAA  
S T R A G H V P L R V I P I E G E D S K D I K T T P K  
AAAGTTTATTATTTATTTTGTCTACTATGTCGATGGACATCTAGAGATGCTGGTATACCAGATCAATCTGTAGCTACAGGA  
K V Y Y L F C S L C R W T S R D A G I P D Q S V A T G  
GGTTGGCCTGAACAAGAAAATCCTCATACAAACCGGATTAATACTTTAATTGATTATCATAAAATATTAGCTTCTATAGAA  
G W P E Q E N P H T N R I N T L I D Y H K I L A S I E  
AAACAGCAATGTGAGAAAAAGAAATTTGACCAAAGCGTCCCTATATGCAAATTGCTATGTTTGAATAACATCTGCTATG  
K Q C E K K K F R P K R P Y M Q I A M F R I T S A M  
GTTCTGAAACGTATTGGACATCTACAAAACCTGCTACTGAATCAACTGATCAACCATCTCCAGCTATTGCCAGTACAGAA  
V R K R I G H P T K P A T E S T D Q P S P A I A S T E  
GTAGAGGAATTACCAATGATATTTTACGAAACCAATAGAAATACTAAGATTACTACATTGGAACAACGATTACAACAT  
V E E L P I D I F T E P I E I T K I T T L E Q R L Q H  
CCGGACATACAAGCAGAAAATGTAAATGAATTACGCCCTCAACATAGACAATTGTTAGTTAGAAGATCACAACGATGTGCA  
P D I Q A E N V N E L R P Q H R Q L L V R R S Q R C R  
GTTTGGACACATCTCTGTAAACAGATTTTTGTACACACTCTGCAAAGTTTAAATACAATTAGCTGCAATTTTATCAC  
V C E H N L C K P D F C T H S A K F K I Q L A A F Y H  
GTACCAGAAAGTAAGGATTGTTACTTGTGAACCACTTCGCCCCAGTAAATCAAGTGAATTGCTTTTAAAGTTTTCATCCCA  
V P E V R I V T C E P L R P G K S S E L L L K F C N P  
ACTCAACATCAAACCTCAGATAATCTTTTATCATTTGGATACACCTTACACCTATTTTAACAGCTGTTGATGAAAAAGAA  
T Q H Q T Q I I L L S L D T P L T P I L T A V D E K E  
GAATTTAAGCAAGAAAATATACAAACAGGGATCTGAATCTCCAAATTTATTACCTTCTATCGTGCAGCAAGTGCCTGTAATA  
E F K Q E N I Q Q G S E S P N L L P S I V R Q V P V I  
GAGGAAACAAAATCTATTAAAATTAATGCAAATGCAGATATAATTCTTCTCATAGCGCTCTTATTTTGCCTCCCAGAGAT  
E E T K S I K I N A N A D I I L P H S A L I L P P R D  
GATGCTGCTGAATATGATGATACTGGTGATACTCATAATTTTCAAGATGATCCTAACTTGTAAATTTGGCGAAAAGGTAAT  
D A A E Y D D T G D T H N F Q D D P K L V I W R K G N  
AAAGCTGTAATAAAATTACATGTAATACCACATGAAAATATACAAGAAAGTGATAGTCAACAAGTTATAATTGGCTTTGTT  
K A V I K L H V I P H E N I Q E S D S Q Q V I I G F V  
ATGCAATATGGATATGTGAATACTATTACTACATTAGAACATAAAGCACCTCAAAAATTAATGATCTTAAAGTTAAACCTTAT  
M Q Y G Y V N T I T T L E H K A P Q K L D L K V K L Y  
CTTACTATAGGCAATATTGTTGGAAGTGCTTAATGCTTATATCATGAATATTAATATTATTAATATAAAAAATAAG  
L T I G N I V G S A \*  
TTCAAT TAACCTTCAGTAAATAATATACATTTCTCAGGCTGCACACAT

图3 中华蜜蜂 *dynactin p62* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *dynactin p62* from *Apis cerana cerana*

箭头表示引物序列 The arrow indicates the primer sequence. 阴影示中华蜜蜂 *dynactin p62* 蛋白的 2 个结构域 The two domains of *A. c. cerana* *dynactin p62* protein are in shade.

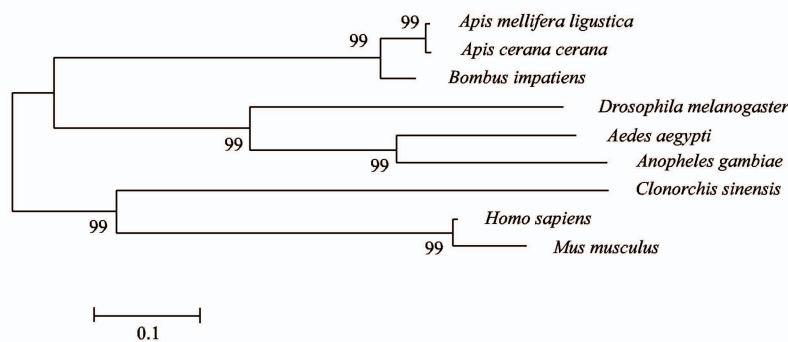


图5 中华蜜蜂与其他物种 *dynactin p62* 氨基酸序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *dynactin p62* from *Apis cerana cerana* and other species

系统发育树用邻位相连法进行了 2 400 次重复构建, 数值代表物种之间的序列差异。Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining with 2 400 replications, and the number represents the sequence differences among the species.

本研究克隆了中华蜜蜂 *dynactin p62* 基因序列, 为研究中华蜜蜂级型分化机理奠定了前期基础。

*dynactin p62* 在中华蜜蜂不同级型及不同发育阶段都有显著的表达差异, 这表明该基因的表达受

时间和空间的影响, 这一特性使它能够不同的阶段调控不同的生理过程。中华蜜蜂 *dynactin p62* 在工蜂幼虫和刚羽化的 1 日龄工蜂中表达量都显著高于同期发育的蜂王, 这与已有的西方蜜蜂研究结果



<i>Apis mellifera</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	56
<i>Apis cerana cerana</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	56
<i>Bombus impatiens</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	56
<i>Homo sapiens</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	56
<i>Mus musculus</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	56
<i>Clonorchis sinensis</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	56
<i>Aedes aegypti</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	56
<i>Anopheles gambiae</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	56
<i>Drosophila melanogaster</i>	MSYLNQPTCVHYVNGGSS--LKFIKLYFCRHCCKIRGQYCVQCCEVPS--HYCFNCMENL	55
<i>Apis mellifera</i>	PS-----SEVRIKKN-----KCSNCFKCPCCFOT	80
<i>Apis cerana cerana</i>	PS-----SEVRIKKN-----KCSNCFKCPCCFOT	80
<i>Bombus impatiens</i>	PS-----SEVRIKKN-----KCSNCFKCPCCFOT	80
<i>Homo sapiens</i>	PS-----SEVRIKKN-----KCSNCFKCPCCFOT	80
<i>Mus musculus</i>	STRATISITQLPDDPAKTTMKRAYLACGFCRWTSRDVGMADKSVGEKANCDFPCGCMHT	120
<i>Clonorchis sinensis</i>	AS-----ADAKIRKN-----KCSNCFKCPCCFOT	80
<i>Aedes aegypti</i>	PS-----SEVRIKKN-----KCSNCFKCPCCFOT	80
<i>Anopheles gambiae</i>	PS-----SEVRIKKN-----KCSNCFKCPCCFOT	80
<i>Drosophila melanogaster</i>	PS-----SEVRIKKN-----KCSNCFKCPCCFOT	79
<i>Apis mellifera</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	119
<i>Apis cerana cerana</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	119
<i>Bombus impatiens</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	119
<i>Homo sapiens</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	115
<i>Mus musculus</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	153
<i>Clonorchis sinensis</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	113
<i>Aedes aegypti</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	136
<i>Anopheles gambiae</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	140
<i>Drosophila melanogaster</i>	LSRAGHVPIRPIIEGEDSKDI-----KTPPKYVYLLGSLCR	136
<i>Apis mellifera</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	177
<i>Apis cerana cerana</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	177
<i>Bombus impatiens</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	177
<i>Homo sapiens</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	173
<i>Mus musculus</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	211
<i>Clonorchis sinensis</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	171
<i>Aedes aegypti</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	196
<i>Anopheles gambiae</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	200
<i>Drosophila melanogaster</i>	WTSDAIGIDQSVATGEWPPQDNPHNINRINTLDYHKILASIRKQOCE--KKFERKKPY	196
<i>Apis mellifera</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	224
<i>Apis cerana cerana</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	224
<i>Bombus impatiens</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	224
<i>Homo sapiens</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	232
<i>Mus musculus</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	270
<i>Clonorchis sinensis</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	225
<i>Aedes aegypti</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	247
<i>Anopheles gambiae</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	251
<i>Drosophila melanogaster</i>	MQIAMF-----ITSAMVRKRICHPTKPTT-----ESTDQP-----SPAVASTVEEELFID-I	244
<i>Apis mellifera</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	284
<i>Apis cerana cerana</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	284
<i>Bombus impatiens</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	284
<i>Homo sapiens</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	292
<i>Mus musculus</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	330
<i>Clonorchis sinensis</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	285
<i>Aedes aegypti</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	307
<i>Anopheles gambiae</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	311
<i>Drosophila melanogaster</i>	FTETITITRITITLQRILQHPDITQANVNEIRLPHRQLVVRASQRCRUCENHLKQDFCTH	304
<i>Apis mellifera</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	311
<i>Apis cerana cerana</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	311
<i>Bombus impatiens</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	311
<i>Homo sapiens</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	319
<i>Mus musculus</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	357
<i>Clonorchis sinensis</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	345
<i>Aedes aegypti</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	334
<i>Anopheles gambiae</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	339
<i>Drosophila melanogaster</i>	SKKFKIQLAAFYVHPVIRVITCEP-----LRP	332
<i>Apis mellifera</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	327
<i>Apis cerana cerana</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	361
<i>Bombus impatiens</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	361
<i>Homo sapiens</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	345
<i>Mus musculus</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	383
<i>Clonorchis sinensis</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	401
<i>Aedes aegypti</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	389
<i>Anopheles gambiae</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	399
<i>Drosophila melanogaster</i>	GKSSSELILKFCNPTQHQTCHILSLSDTPLTP-----ILTAVDEKEEFKQENTQQG	388
<i>Apis mellifera</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	382
<i>Apis cerana cerana</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	416
<i>Bombus impatiens</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	416
<i>Homo sapiens</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	382
<i>Mus musculus</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	420
<i>Clonorchis sinensis</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	457
<i>Aedes aegypti</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	440
<i>Anopheles gambiae</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	458
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----SESPNLPSIVRQVPVIEETKSKINANADILPHSALILPRDDAAEYDDTGDT-	436
<i>Apis mellifera</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	429
<i>Apis cerana cerana</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	463
<i>Bombus impatiens</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	463
<i>Homo sapiens</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	424
<i>Mus musculus</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	462
<i>Clonorchis sinensis</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	517
<i>Aedes aegypti</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	483
<i>Anopheles gambiae</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	501
<i>Drosophila melanogaster</i>	--HNFODDPRLVWRKKNRAVIRLHVIPHENIQE-----SDSQVILGFMVMOYG	479
<i>Apis mellifera</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	462
<i>Apis cerana cerana</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	496
<i>Bombus impatiens</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	496
<i>Homo sapiens</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	460
<i>Mus musculus</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	498
<i>Clonorchis sinensis</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	562
<i>Aedes aegypti</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	521
<i>Anopheles gambiae</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	551
<i>Drosophila melanogaster</i>	YVNTITITL-----HKAFQKLDLKVRYLITIGNIVGNA-----	514

图4 中华蜜蜂与其他物种 *dynactin p62* 氨基酸序列的比较Fig. 4 Amino acid sequence alignment of *dynactin p62* among *Apis cerana cerana* and other species

黑色阴影表示保守性极高的残基位点; 灰色阴影表示保守性较高的残基位点; 缺失位点由点代替。Identical amino acids are shaded in black; amino acids with higher identity are shaded in grey; and gaps are indicated by dots.



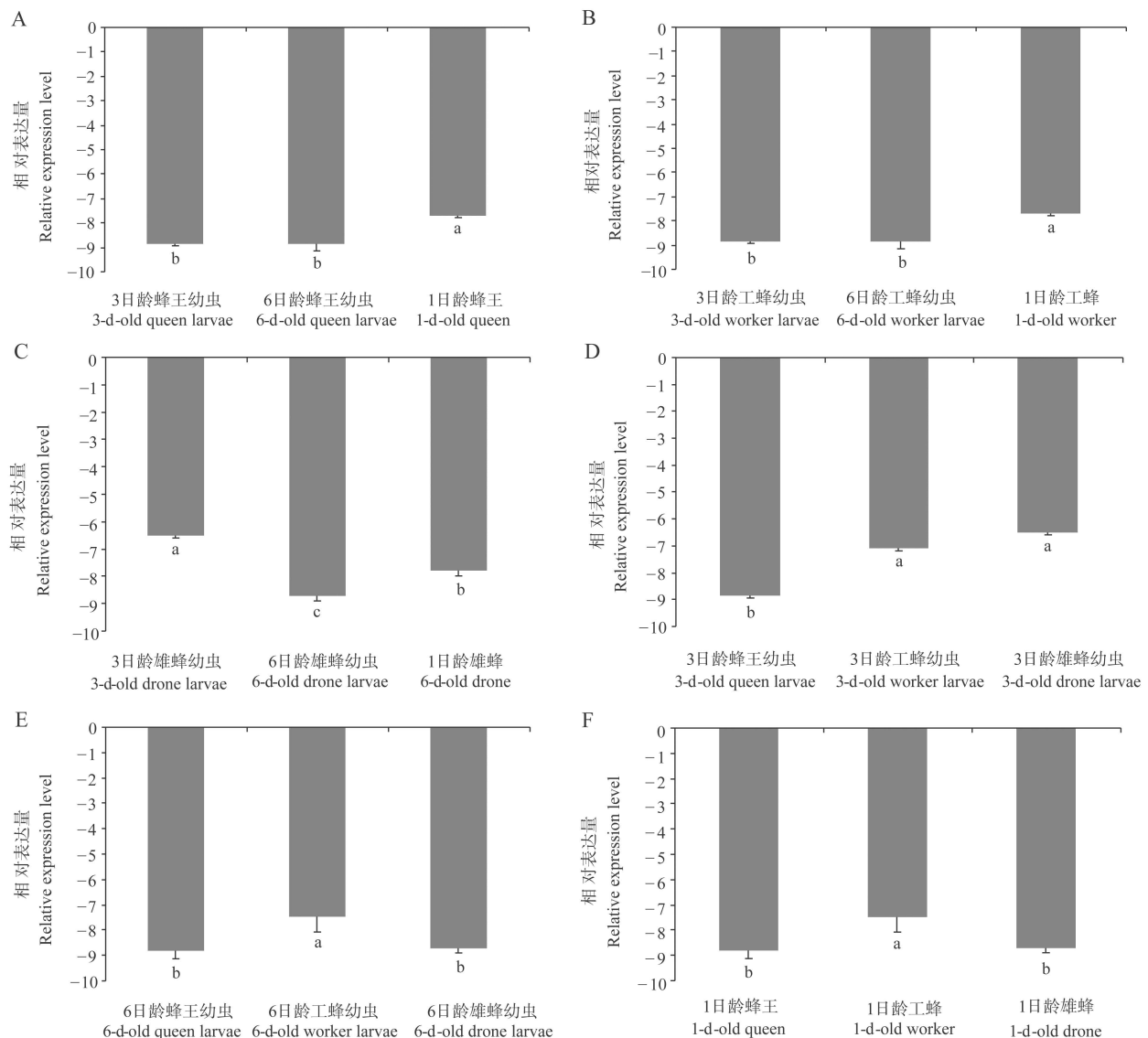


图6 *dynactin p62* 在中华蜜蜂蜂王、工蜂和雄蜂各时期的表达量

Fig. 6 Expression level of *dynactin p62* in different developmental stages of *Apis cerana cerana* queen, worker and drone

A: 不同日龄蜂王 Different developmental stages of queen; B: 不同日龄工蜂 Different developmental stages of worker; C: 不同日龄雄蜂 Different developmental stages of drone; D: 3日龄蜂王、工蜂和雄蜂幼虫 3 d-old queen, worker and drone larvae; E: 6日龄蜂王、工蜂和雄蜂幼虫 6 d-old queen, worker and drone larvae; F: 1日龄蜂王、工蜂和雄蜂 1 d-old queen, worker and drone. 柱上不同的字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ , 单因素方差分析)。Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level (One-way ANOVA variance analysis).

一致 (Kucharski *et al.*, 2008)。*dynactin p62* 在雄蜂中表达量没有明显规律性, 因此我们推测 *dynactin p62* 可能主要参与调控雌蜂的级型分化。但目前还不清楚中华蜜蜂 *dynactin p62* 甲基化位点调控机理以及每个甲基化位点的功能, 这些都还有待于进一步研究。

**致谢** 实验中得到了江西农业大学蜜蜂研究所田柳青、王欢、秦秋红、刘亭亭等同学的支持和帮助, 在此表示衷心的感谢。

## 参考文献 (References)

- Dahl C, Guldberg P, 2003. DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology*, 4(4): 233–250.
- Garces JA, Clark IB, Meyer DI, Vallee RB, 1999. Interaction of the p62 subunit of dynactin with Arp1 and the cortical actin cytoskeleton. *Current Biology*, 9: 1497–1500.
- Hornik K, 2011. R FAQ. ISBN 3-900051-08-9. <http://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>.
- Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RF, 2012. Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(3):

- 297–302.
- Karki S, Tokito MK, Holzbaur ELF, 2000. A dynactin subunit with a highly conserved cysteine-rich motif interacts directly with Arp1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18): 4834–4839.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319: 1827–1830.
- Liu TT, Liu JF, Wang WX, Wang H, Wang ZL, Zeng ZJ, Yan WY, 2012. Cloning and expression profiling of the DNA methyltransferase Dnmt3 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(3): 284–290. [刘亭亭, 刘俊峰, 王文祥, 王欢, 王子龙, 曾志将, 颜伟玉, 2012. 中华蜜蜂 DNA 甲基化转移酶 Dnmt3 基因克隆及表达谱分析. 昆虫学报, 55(3): 284–290]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *methods*, 25(4): 402–408.
- Shi YY, Huang ZY, Zeng ZJ, Wang ZL, Wu XB, Yan WY, 2011. Diet and cell size both affect queen-worker differentiation through DNA Methylation in honey bees (*Apis mellifera*, Apidae). *PloS ONE*, 6(4): e18808.
- Shi YY, Zeng ZJ, Wu XB, Yan WY, Wang ZL, 2011. Influence of injecting Dnmt3 siRNA on the development of females of the Italian honeybee, *Apis mellifera ligustica*. *Acta Entomologica Sinica*, 54(3): 272–278. [石元元, 曾志将, 吴小波, 颜伟玉, 王子龙, 2011. 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂雌蜂发育的影响. 昆虫学报, 54(3): 272–278]
- Spiess A, Ritz C, 2010. qPCR: modelling and analysis of real-time PCR data. R Package Version 1.3–4.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443: 931–949
- Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado MA, Robinson GE, 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314: 645.
- Wu CT, Morris JR, 2001. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293: 1103–1105.
- Yang GH, 2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 401–406. [杨冠煌, 2005. 引入西方蜜蜂对中华蜂的危害及生态影响. 昆虫学报, 48(3): 401–406]
- Zeng J, Soojin VY, 2010. DNA methylation and genome evolution in honeybee: gene length, expression, functional enrichment covary with the evolutionary signature of DNA methylation. *Genome Biology Evolution*, 2: 770.

(责任编辑: 赵利辉)